



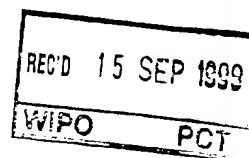
PCT/NL 99 / 00509

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

NL 99 / 509
Bureau voor de Industriële Eigendom



EJW

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 10 augustus 1998 onder nummer 1009834,
ten name van:

Stanislaus Laurens Johan WOUTERS

te 's-Gravenmoer en

Heinz Helmut RENGGLI

te Malden en

Daniëlle Angelique HORBACH

te Utrecht

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Antistoffen voor toepassing in de gerichte en tijdelijke behandeling van mens en dier",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 8 september 1999.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

mw. I.W. Scheevelenbos - de Reus.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1009834

B. v. d. I.E.

- 6 NOV. 1998

UITTREKSEL

De uitvinding heeft betrekking op een antistof,
of een fragment van een antistof, welke aan een epitooop
bindt onder specifiek gekozen omstandigheden en waarvan
de binding met dat epitooop wordt verbroken onder speci-
5 fiek gekozen andere omstandigheden, alsmede een antistof,
of fragment daarvan, waaraan eventueel een diagnostisch,
therapeutisch of cosmetisch actieve stof geconjugeerd is,
voor de gerichte en tijdelijke diagnostische, therapeuti-
sche of cosmetische behandeling van uitwendig toeganke-
10 lijke delen van het menselijk en dierlijk lichaam, waar-
bij zowel de specifiek gekozen bindingsomstandigheden als
de omstandigheden waarbij de binding wordt verbroken
binnen fysiologisch aanvaardbare grenzen liggen en worden
gevormd door de pH en/of ionsterkte. De uitvinding be-
15 treft verder het gebruik van een dergelijke antistof, of
fragment daarvan, voor het vervaardigen van een medica-
ment voor de gerichte en tijdelijke behandeling van uit-
wendig toegankelijke delen van het menselijk en dierlijk
lichaam, alsmede een samenstelling omvattende ten minste
20 één antistof, of een fragment daarvan, volgens de uitvin-
ding zoals een gebitsreinigingsmiddel, spoelwater, mond-
spray, kauwtablet, crème of zalf.

**ANTISTOFFEN VOOR TOEPASSING IN DE GERICHTE EN
TIJDELIJKE BEHANDELING VAN MENS EN DIER**

De uitvinding heeft betrekking op antistoffen, of fragmenten daarvan, die kunnen worden gebruikt voor het "targetten" van (diagnostisch, therapeutisch, en cosmetisch) actieve stoffen op gewenste epitopen. De
5 uitvinding heeft verder betrekking op het gebruik van deze antistoffen, of fragmenten daarvan, in de gerichte en tijdelijke diagnostische, therapeutische en cosmetische behandeling van uitwendig toegankelijke delen van het menselijk en dierlijk lichaam.

10 Het gebruik van een antistof-antigeen binding om een therapeutisch of diagnostisch actieve stof te lokaliseren op een bepaald epitop op een specifieke plaats van het lichaam is op zichzelf al bekend. In US-5490988 en WO 95/01155 worden bijvoorbeeld antistoffen en
15 fragmenten van antistoffen beschreven, waaraan een therapeutisch actieve stof wordt gekoppeld voor het "targetten" van antimicrobiële stoffen op epitopen van pathogene verbindingen in de mondholte. In EP 0736544 worden antistoffen beschreven die specifiek
20 eiwitstructuren op de tand herkennen waardoor zeer gericht en lokaal therapeutische of cosmetische stoffen op de tand kunnen worden aangebracht. Door de gerichte en lokale toediening van actieve stoffen, wordt een maximale effectiviteit van deze stoffen bereikt.

25 Door conjugatie aan een kleurstof (bijvoorbeeld erythrocine) kunnen dergelijke antistoffen, of fragmenten daarvan, voor de detectie van bijvoorbeeld tandplaque worden gebruikt. Door een vroege detectie van tandplaque bestaat de mogelijkheid om de plaque te verwijderen
30 voordat het tot infectieuze of carieuze aandoeningen van het gebit en/of omringende weefsels aanleiding geeft. Door het in contact brengen van het gebit en omringende weefsels met de antistof gekoppeld aan een kleurstof die de plaque detecteert, kan de plaque zichtbaar worden
35 gemaakt en vervolgens worden verwijderd door het gebit en de omringende weefsels te reinigen, met name op die plaatsen waar de aanwezigheid van plaque vastgesteld is.

Een nadeel van het gebruik van antistoffen, of fragmenten daarvan, voor de detectie van tandplaque via deze methode, is het feit dat de antistof/epitoot binding niet snel wordt verbroken, waardoor eventuele met het oog
5 zichtbare kleurstoffen gedurende langere tijd zichtbaar blijven. Dit kan worden vermeden door toepassing van op fluoresceïne gebaseerde kleurstoffen die alleen zichtbaar zijn tijdens beschijning met UV-licht. Deze middelen zijn echter nogal omslachtig in het gebruik en niet
10 gemakkelijk voor de consument toepasbaar.

De therapeutische behandeling van ontstekingen in de mondholte met bijvoorbeeld systemische antibiotica heeft als belangrijk nadeel dat het antibioticum zich door het gehele lichaam verspreidt en ook andere organen
15 en weefsels bereikt, waardoor de natuurlijke microbiële flora van bijvoorbeeld het maag-darmkanaal kan worden verstoord. Het gebruik van antibioticagel in de mondholte kan dit weliswaar voorkomen, maar heeft als nadeel dat het niet goed blijft zitten.

20 Het is het doel van de uitvinding om bovengenoemde nadelen te vermijden. Dit wordt door de uitvinding bereikt door het verschaffen van antistoffen, of fragmenten daarvan, die aan een epitoot binden onder specifiek gekozen omstandigheden, en die van dat epitoot
25 elueren onder specifiek gekozen andere omstandigheden. Door de omstandigheden zodanig te veranderen dat de binding tussen epitoot-en antistof wordt verbroken, kunnen de antistoffen op ieder gewenst moment worden verwijderd. Op deze manier kan bijvoorbeeld een
30 ontsteking in de mondholte zeer lokaal en gericht worden behandeld, en kunnen antistoffen, die zijn gekoppeld aan een kleurstof en worden gebruikt voor de detectie van tandplaque, op ieder gewenst moment worden verwijderd, zonder dat lippen, tong en tandvlees gedurende langere
35 tijd gekleurd blijven.

Een antistof volgens de uitvinding wordt geselecteerd met behulp van de op zichzelf bekende 'faag-display' techniek. Faag-display is een techniek om humane

antistoffen te maken die voor diagnostische of
therapeutische doeleinden en/of voor gebruik in de
research kunnen dienen. De faag-display techniek maakt
gebruik van de mogelijkheid om eiwitten tot expressie te
5 brengen in de mantel van bacteriofagen. In deze techniek
worden bacteriofagen getransfecteerd met humane variabele
(V) genen, die de basis vormen voor de samenstelling van
humane antistoffen. Door te zorgen dat de
gesynthetiseerde antistoffen als fusie-eiwitten met een
10 bacteriofaag mantel-eiwit (bijv. g3p) tot expressie komen
verschijnen g3p-antistof fusie-eiwitten na synthese op
het oppervlak van de bacteriofaag. In de praktijk brengt
de bacteriofaag slechts een deel van een antistofmolecuul
tot expressie, een single chain Fv-fragment (scFv).

15 Er bestaan grote zogenaamde faag-bibliotheken
(of-banken) van scFv-fragmenten met verschillende
antistofspecificiteiten. Dergelijke faag-bibliotheken
worden gebruikt om de antistoffragmenten te selecteren
met de specifieke eigenschap dat deze antistoffragmenten
20 met hoge affiniteit aan een bepaald epitoom binden onder
specifiek gekozen eigenschappen en dat de binding tussen
antistoffragment en epitoom wordt verbroken bij specifiek
gekozen andere omstandigheden.

Deze specifiek gekozen omstandigheden kunnen
25 bijvoorbeeld worden gevormd door de pH of de ionsterkte.
Voor toepassing in de behandeling van het menselijk en
dierlijk lichaam liggen deze omstandigheden bij voorkeur
binnen fysiologisch aanvaardbare grenzen. Voor gebruik in
de mondholte kan de pH bijvoorbeeld tussen 4 en 8,5 en de
30 ionsterkte tussen 0 en 13 M worden gevarieerd.

Met behulp van een selectie procedure, zoals
beschreven in voorbeeld 1, worden monoclonale faag-
antistof fragmenten (scFv) verkregen, met de voor de
toepassing gewenste eigenschappen als affiniteit,
35 specificiteit en pH en/of ionsterkte gevoeligheid. Deze
scFv-fragmenten bevatten geen constant (Fc) deel.
Voor de toepassing volgens de uitvinding heeft het de
voorkeur om bivalente antistoffen te maken omdat dit de

affiniteit sterk kan verhogen. Het DNA dat codeert voor de gewenste scFv fragmenten wordt overgezet in speciale eukaryotische expressievectoren die het DNA bevatten dat codeert voor het constante gedeelte (Fc) van de antistoffen. Afhankelijk van de gebruikte vector worden intacte humane monoclonale antistoffen van het type IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 of IgE geproduceerd. De door de vectoren gesynthetiseerde antistoffen kunnen uit het kweekmedium worden geïsoleerd.

- 10 Wanneer de affiniteit van de geselecteerde scFv-antistoffragmenten hoog genoeg blijkt te zijn is het niet direct noodzakelijk volledige antistoffen te maken. Het DNA dat codeert voor de scFv-fragmenten kan dan direct in speciale expressie-vectoren worden overgezet, zodat de scFv-fragmenten niet als faag-gebonden antistoffragmenten, maar als oplosbare fragmenten gesynthetiseerd worden, die vervolgens uit het kweekmedium kunnen worden geïsoleerd.

Aan de verkregen antistoffen of fragmenten kunnen diagnostisch, therapeutisch of cosmetisch actieve stoffen gekoppeld worden zoals beschreven in EP 0453097, EP 0451972 en EP 0450800, of volgens Lal et al. (Immunol Meth. 1985; 79:307-318).

Onder "fragmenten" worden F(ab)-, F(ab)₂- of scFv-fragmenten begrepen.

Dergelijke stoffen kunnen bijvoorbeeld enzymen, kleurstoffen, fluorescente stoffen, radioactieve stoffen of antimicrobiële verbindingen zijn. Enzymen kunnen worden gebruikt als antimicrobiële middelen (therapeutisch), of als bleekmiddel voor het verwijderen van aanslag op de tanden (cosmetische behandeling). Kleurstoffen kunnen worden gebruikt voor de detectie van bijvoorbeeld tandplaque (diagnostisch). Antimicrobiële verbindingen kunnen worden gebruikt voor behandeling van ontstekingen in de mondholte of andere uitwendig toegankelijke delen van het lichaam.

Antistoffen, of fragmenten daarvan, volgens de uitvinding kunnen worden gebruikt voor de behandeling van

diagnostische behandeling van de mondholte de detectie van plaque omvat.

18. Antistof, of een fragment van een antistof, volgens conclusie 1-15 **met het kenmerk dat de** 5 therapeutische behandeling van de mondholte het verwijderen van plaque omvat.

19. Antistof, of een fragment van een antistof, volgens conclusie 1-15 **met het kenmerk dat de** therapeutische behandeling het behandelen van infecties 10 in uitwendig toegankelijke delen van het menselijk of dierlijk lichaam omvat.

20. Antistof, of een fragment van een antistof, volgens conclusie 2-19 waarin de actieve stof een enzym is.

15 21. Antistof, of een fragment van een antistof, volgens conclusie 20 **met het kenmerk dat** het enzym een oxidase (bijv. glucose oxidase, lactase oxidase of "uric acid" oxidase), een peroxidase (bijv. "horse radish" peroxidase, myeloperoxidase, lactoperoxidase, of 20 chloroperoxidase), een protease (bijv. papaine, pepsine, trypsine, ficine of bromeline), een celwand lyserend enzym (bijv. lysozym), of een plaque matrix remmer (bijv. dextranase of mutanase) is.

22. Antistof, of een fragment van een antistof, 25 volgens conclusie 2-19 waarin de actieve stof een fluorescente of radioactieve stof is.

23. Antistof, of een fragment van een antistof, volgens een van de voorgaande conclusies **met het kenmerk dat** de antistof, of fragment van een antistof, is gericht 30 tegen epitopen van pathogene micro-organismen of andere pathogene verbindingen.

24. Antistof, of een fragment van een antistof, volgens conclusie 23, **met het kenmerk dat** de pathogene micro-organismen bijvoorbeeld Actinomyces actinomycetem 35 comitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Streptococcus mutans, Bacteroides forsythus, Eikenella corrodens, Treponema denticola, Campylobacter lectus of Fusobacterium nucleatum zijn.

25. Samenstelling omvattende tenminste één antistof, of een fragment van een antistof, volgens een der voorgaande conclusie samen met een gebruikelijk verdunningsmiddel of oplosmiddel of gebruikelijke drager.

5 26. Samenstelling volgens conclusie 25 **met het kenmerk dat** de samenstelling een gebitreinigingsmiddel, spoelwater, mondspray, kauwtablet, kauwgum, crème of zalf is.

10 27. Gebruik van een antistof, of een fragment van een antistof, volgens een van de voorgaande conclusies voor het vervaardigen van een medicament voor de gerichte en tijdelijke behandeling van uitwendig toegankelijke delen van het menselijk en dierlijk lichaam.